

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2008. – Вип. 16, т. 1. – С. 78–83.
Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology. Ecology. – 2008. – Vol. 16, N 1. – P. 78–83.

УДК 579.22+577.15

И. В. Жерносекова, А. А. Тымчук, А. Г. Понизовцева,
Н. П. Черногор, А. И. Винников

Днепропетровский национальный университет

БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МУТАНТНОГО ШТАММА 2P-15 В ПРИСУТСТВИИ ЭКЗОГЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ

Досліджено дію екзогенних амінокислот на прояв біосинтетичної активності рифампіцин-стійкого штаму 2P-15. Показано, що амінокислоти в оптимальних концентраціях (50, 100, 200 мкг/мл) викликають максимальне збільшення синтезу білка, накопичення біомаси, активності стафілолітичних ферментів і продуктивності стрептоміцету в умовах глибинної ферментації. Всі досліджені амінокислоти забезпечили підвищення стимулювальної активності штаму в 2,0–3,7 рази.

I. V. Zhernosekova, A. A. Tymchuk, A. G. Ponizovtseva,
N. P. Chernogor, A. I. Vinnikov

Dnipropetrovsk National University

BIOSYNTHETICAL DESCRIPTION OF MUTANT STRAIN 2P-15 IN THE PRESENCE OF EXOGENOUS AMINO ACIDS

The effect of exogenous amino acids on the biosynthetic activity of 2P-15 rifampycin-resistant strain was studied. Addition of the amino acids to the medium for the 2P-15 cultivation in the optimal concentrations (50, 100, 200, µg/ml) entailed the augmentation of a synthesis of protein, biomass, activity of staphylococcus-lytic enzymes and strain's productivity in the conditions of deep fermentation. All studied amino acids ensure the increase of stimulating activity of the mutant 2P-15 strain 2.0-3.7 times.

Введение

Коммерческое производство продуктов, которые синтезируются микроорганизмами в результате их жизнедеятельности, является приоритетом традиционной биотехнологии. В последнее время существенно расширился список ценных биотехнологических продуктов, с помощью которых преодолеваются продовольственные, энергетические, сырьевые и экологические проблемы. Для создания высококачественного продукта необходимо наличие высокоактивных культур микроорганизмов – продуцентов биологически активных веществ, получение которых возможно как традиционными методами селекции, пропластированием, так и методами генетической инженерии [3; 6; 14; 15].

Известно, что для реализации высокой активности штаммов продуцентов большое значение имеют физико-химические показатели среды, источники питания, экзогенные факторы роста: аминокислоты, пурины, пиримидины, требуемые в малых количествах [15; 17; 18]. У многих микроорганизмов потребности в питательных веществах изучены пока недостаточно и их удается культивировать лишь на средах, содержащих сложные природные компоненты, такие как сыворотка крови, жидкость

рубца, дрожжевой автолизат или пептоны [4; 16]. Микроорганизмы способны изменять свой обмен в соответствии с изменениями окружающей среды, что открывает возможность для управления их ростом и ферментативной активностью [3; 17].

Применение различных стимуляторов вызывает изменение метаболических процессов у микроорганизмов в сторону увеличения выхода конечного продукта, повышения окислительно-восстановительных процессов, биосинтеза белка и проницаемости клеточных мембран [17; 20]. Особого внимания заслуживают стимуляторы химической природы – ростовые факторы и предшественники синтеза макромолекул, а именно аминокислоты. Так, внесение гистидина и глутаминовой кислоты в среду культивирования грибов – продуцентов пектолитических ферментов – вызывает усиление их роста и активизацию синтеза энзимов [1]. Экзогенный метионин усиливает синтез щелочных и нейтральных экзопротеаз у *Acremonium chrysogenum* [13], лизин – биосинтез цефалоспоринов С у *C. aeramonium* [26], а также пенициллина у *P. chrysogenum* [25], глутаминовая кислота повышает выход тилозина у *S. fradiae* [21]. Кроме того, аланин и цистеин усиливают в 1,5–3,0 раза рост и накопление белка в мицелии гриба *Fusarium* [7]. Ауксинообразование у фото- и гетеротрофных бактерий [8; 10; 11] также усиливается под воздействием экзогенных аминокислот. Добавление триптофана в концентрациях 50–200 мкг/мл в среды выращивания культур *Sphingomonas sp.* 18, *Mycobacterium sp.* 1, *Rhizobium sp.* 5 увеличивает образование ауксина (ИУК) в 28, 30 и 34 раза, а к бактериям *Rhodococcus sp.* 37 и *Pseudomonas sp.* 24 – в 124 и 103 раза соответственно [19]. Эксперименты *in vitro* показали, что только некоторые бактериальные культуры могут синтезировать небольшое количество ИУК без добавления экзогенного триптофана, являющегося его метаболическим предшественником [9; 23].

Учитывая, что аминокислоты служат строительными блоками для образования основных компонентов микробных клеток – белков, а также ферментов, способствуя усилению биосинтетических процессов у многих микроорганизмов, целью данной работы было установить влияние экзогенных аминокислот на проявление биосинтетических свойств мутантного штамма стрептомицета 2P-15.

Материал и методы исследований

Объектом исследования был штамм стрептомицета, устойчивый к рифампицину – *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15, синтезирующий комплекс бактериолитических ферментов и стимулятор роста [6; 20]. Исследования литической активности продуцента проводили с использованием музейного штамма *S. aureus* 209 P; стимулирующей активности – промышленного штамма *C. tropicalis* 51. Биосинтетическую активность определяли при глубинном культивировании штамма-продуцента на ферментационной среде на протяжении 72 ч при +28°C, в рабочем объеме среды 50 мл и частоте вращения качалки 220 об./мин. [6]. Массу мицелия стрептомицета, отфильтрованного, отмытого 5 % раствором ТХУ и высушенного при +105°C до постоянного веса, определяли весовым методом и выражали в мг/мл. В работе использовали аминокислоты фирмы «Реахим», которые добавляли после стерилизации до конечной концентрации 50, 100, 200 мкг/мл. Стафилолитическую активность определяли турбидиметрическим методом Isono [4] и выражали в ед./мл или ед./мг белка. Белок в пробах определяли методом Bradford [28].

При исследовании ростстимулирующей активности продуцента фильтраты культуральной жидкости (КЖ) предварительно инактивировали автоклавированием. Исследуемые растворы, разведенные 1:10, вносили в стерильную синтетическую сре-

среду Ридера из расчета 1 % от объема. Инокулятом служила суточная агаризованная культура дрожжей, приготовленная по стандарту мутности 10. О ростстимулирующей активности штамма *2P-15* судили по величине прироста биомассы дрожжей в сравнении с контролем, которую выражали в %. Накопление биомассы дрожжей оценивали оптическим методом на КФК 2 МП при 590 нм в кювете шириной 0,5 см. Стимулирующую активность рассчитывали по формуле, предложенной Н. П. Черногор [20], и выражали в ед./мл. Все эксперименты проводили в трех повторностях и обрабатывали статистически.

Результаты и их обсуждение

Синтез белка штаммом *2P-15* в присутствии треонина (табл. 1) увеличился при действии всех исследуемых концентраций, достигнув максимального показателя 156 % к контролю. Показатели синтеза белка при минимальной (50 мкг/мл) и максимальной (200 мкг/мл) концентрации кислоты также превысили контроль, но в меньшей степени, и составили 147 и 139 % соответственно. Очевидно, концентрация треонина 100 мкг/мл является оптимальной для стрептомицета, вызывая самое большое увеличение биосинтеза белка. Из данных литературы известно, что треонин не формирует аминокислотного фонда в микробной клетке, а немедленно сразу после проникновения включается в белок [2]. В присутствии ароматической аминокислоты триптофана биосинтез белка у продуцента стал выше контрольного уровня на 27 % только при минимальной ее концентрации. Известно, что ароматические аминокислоты полностью в неизменном виде используются микробной клеткой на биосинтетические цели [2].

Таблица 1

Биосинтетические характеристики штамма *2P-15* в присутствии аминокислот

Концентрация, мкг/мл		Белок		Биомасса		Литическая активность		Удельная активность		Продуктив- ность		Удельная скорость роста, μ	
		мг/мл	% от К	мг/мл	% от К	ед/мл	% от К	ед./мг	коэфф. разл.	ед./мг	% от К	μ^{-1}	коэфф. разл.
Контроль (без аминокислоты)		0,33	100	11,5±0,06	100	2800±148	100	8485	1,0	243,5	100	0,16	1,0
Трипто- фан	50	0,421	127	11,6±0,08*	101	4000±224	143	9501	1,1	344,8	141	0,16	1,0
	100	0,289	87	11,6±0,06*	101	3733±96	133	12916	1,5	321,8	132	0,16	1,0
	200	0,296	90	10,0±0,10	87	2600±132*	93	8783	1,0	260,0	107	0,14	0,9
Трео- нин	50	0,484	147	10,2±0,10	89	3733±101	133	7713	0,9	366,0	150	0,14	0,9
	100	0,515	156	15,0±0,08	130	3733±98	133	7248	0,8	248,9	102	0,21	1,3
	200	0,460	139	16,6±0,12	144	3200±82*	114	6956	0,8	192,8	79	0,23	1,4
Глута- миновая к-та	50	0,242	73	13,2±0,05	115	3466±86	124	14322	1,7	262,6	108	0,18	1,1
	100	0,234	71	12,4±0,08	108	3466±82	124	14812	2,1	279,5	115	0,17	1,1
	200	0,265	80	24,4±0,14	212	3200±79*	114	12075	1,4	131,1	54	0,34	2,1
Арги- нин	50	0,234	71	14,2±0,13	123	4533±183	162	19371	2,3	319,2	131	0,20	1,2
	100	0,289	87	22,6±0,10	196	3200±96*	114	11073	1,3	141,6	58	0,31	1,9
	200	0,242	73	10,8±0,06	94	4000±160	143	16529	1,9	370,4	152	0,15	0,9

Примечание: * – $p < 0,05$.

Присутствие аминокислот (глутаминовой, аргинина) не вызвало увеличения синтеза белка у мутантного штамма *2P-15* ни в одной из исследуемых концентраций. Их показатели ниже контрольного уровня (колебались в пределах 71–87 %). Это объясняется тем, что глутаминовая кислота очень быстро образует внутриклеточный пул, но он только частично расходуется для биосинтеза, а аргинин образует относи-

тельно большой пул, который сохраняется в течение очень большого промежутка времени без каких бы то ни было изменений [2].

Все исследуемые аминокислоты обеспечили увеличение накопления биомассы штаммом на разных уровнях. Присутствие экзогенного треонина способствовало повышению биомассы на 30–44 % при соответствующих концентрациях 100–200 мкг/мл. Это связано с повышением удельной скорости роста μ в 1,3 и 1,4 раза по сравнению с контролем. Глутаминовая кислота и аргинин увеличили накопление биомассы штамма до максимального значения 212 и 196 % соответственно, где μ превысила контроль в 2,1 и 1,9 раза. Аминокислота триптофан не вызывала активного накопления биомассы, так как μ колебалась в пределах контрольного уровня.

Анализируя активность стафилолитических ферментов, синтезируемых продуцентом, следует отметить, что все исследуемые аминокислоты вызывают повышение активности стафилолизин в пределах от 114 до 162 %. Максимальный показатель активности выявлен в присутствии аргинина в концентрации 50 мкг/мл, что и обеспечило самый высокий показатель удельной активности на уровне 19371 ед./мг. Известно, что синтез ферментов усиливается в присутствии экзогенных аминокислот, вносимых в питательную среду для культивирования плесневых грибов, вследствие непосредственного включения их в молекулу активного белка. Авторы полагают, что «аминокислоты-стимуляторы» компенсируют недостающие свободные внутриклеточные аминокислоты, необходимые для синтеза фермента [17].

Поскольку в большинстве опытов стабильные биосинтетические характеристики штамма *2P-15* были получены нами с использованием экзогенного треонина, представляло интерес выяснить возможность замены в среде культивирования продуцента источника азотного питания, а именно соли NH_4NO_3 на треонин в концентрации 100 мкг/мл. Из литературы известно, что аминокислоты служат вторыми по значению питательными субстратами после сахаров и являются для бактерий источниками углерода, азота и энергии [5; 16]. Замена источника азота на треонин привела к снижению всех исследуемых биосинтетических характеристик мутантного штамма *2P-15* (табл. 2).

Таблица 2

Биосинтетические характеристики штамма *2P-15* при замене источника азотного питания

Вариант опыта	Белок		Биомасса		Литическая активность		Удельная активность		Продуктивность		μ	
	мг/мл	% от К	мг/мг	% от К	ед/мл	% от К	ед./мг	коэфф. разл.	ед./мг	% от К	ч ⁻¹	% от К
Контроль	0,46	100	9,6±0,04	100	2089±70,81	100	4541	1,0	217,6	100	0,13	100
Опыт ^Δ	0,104	22	8,58±0,03*	89	1044±34,66*	50	10038	2,2	122,0	56	0,12	92

Примечание: ^Δ – среда с заменой источника азота; * – $p > 0,05$.

Уровень белка был снижен на 78 %, накопление биомассы стрептомицетом не превышало контрольного уровня и достигло лишь 89 %, активность стафилолитических ферментов, лизирующих клетки стафилококка, уменьшилась в 2 раза. Наблюдалось также снижение продуктивности штамма на 44 % на фоне уменьшения удельной скорости роста клеток стрептомицета на 8 %. Таким образом, замена источника азотного питания (NH_4NO_3) аминокислотой треонином, которая привела к снижению всех биосинтетических параметров продуцента, нецелесообразна, так как эта среда оказалась несбалансированной по азотному питанию. Подобное изменение В. Г. Дебабов объясняет при переносе клеток с полноценной среды на минимальную, когда

одновременно с замедлением скорости роста наблюдается резкое уменьшение синтеза стабильных типов РНК (рРНК и тРНК), при этом не возрастает активность ряда ферментов (триптофансинтазы, гомосериндегидрогеназы, треаниндезаминазы) биосинтеза аминокислот, что очевидно, является причиной задержки роста [3].

При исследовании стимулирующей активности штамма *2P-15* на клетках *Candida tropicalis*, получено увеличение оптической плотности (ОД) клеток дрожжей при внесении КЖ в концентрации 1 %. Максимальный прирост биомассы дрожжей (Δ , %) в присутствии аргинина составил 282 % (табл. 3).

Таблица 3

Стимулирующая активность штамма *2P-15* на клетках *Candida tropicalis*

Вариант опыта	Конц. КЖ, %	Оптическая плотность, ОД 590 нм				Стимулирующая активность		Белок мг/мл	Удельная стимулирующая активность	
		$\bar{X} \pm m$	% от К	$\Delta\%$	контр. КЖ, %	ед./мл	% от К		ед./мг	коэфф. различия
Контроль без КЖ	0	0,17 \pm 0,03	100	0	—	0	—	—	—	—
КЖ без аминокислот	1	0,30 \pm 0,08*	176	76	100	2530	100	0,33	7666	1,0
КЖ + триптофан 50	1	0,43 \pm 0,10*	253	153	143	5100	201	0,42	12143	1,6
КЖ + треонин 100	1	0,46 \pm 0,05	270	170	153	5670	224	0,52	10904	1,4
КЖ + глутаминовая кислота 100	1	0,39 \pm 0,05	229	129	130	4300	170	0,23	18696	2,4
КЖ + аргинин 100	1	0,65 \pm 0,03	382	282	217	9400	371	0,29	32414	4,2

Примечание: * – $p < 0,05$.

Уровень стимулирующей активности продуцента в контроле (КЖ без аминокислоты) достиг 2530 ед./мл, в присутствии экзогенного триптофана – 5100, треонина – 5670, глутаминовой кислоты – 4300, аргинина – 9400 ед./мл. Увеличилась также удельная стимулирующая активность в 1,4–4,2 раза по сравнению с контролем.

Выводы

Внесение экзогенных аминокислот в среду выращивания штамма *2P-15* положительно повлияло на биосинтетическую активность продуцента. Активно увеличился синтез белка на 56 % при внесении треонина, выход биомассы стрептомицета – на 112 % в присутствии глутаминовой кислоты, активность стафилолизин – на 62 % при добавлении аргинина, продуктивность штамма – на 50–52 % в присутствии треонина и аргинина. Внесение триптофана повысило стимулирующую активность продуцента в 2,0 раза, треонина – в 2,2, глутаминовой кислоты – в 1,7, аргинина – в 3,7 раза.

Библиографические ссылки

1. Астапович Н. И. Нуклеотидный фонд и метаболизм микробной клетки. – Минск, 1979. – 150 с.
2. Гершанович В. Н. Транспорт аминокислот, полипептидов и органических кислот у бактерий. – М.: Медицина, 1977. – 184 с.
3. Дебабов В. Г. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов / В. Г. Дебабов, В. А. Лившиц // Биотехнология. – М.: Высшая школа, 1988. – Т. 2. – 208 с.

4. Джавец Э. Руководство по медицинской микробиологии / Э. Джавец, Д. А. Мельник, Э. А. Эйдельберг. – М.: Медицина, 1982. – Т. 1. – 368 с.
5. Елинов Н. П. Химическая микробиология. – М.: Высшая школа, 1989. – 448 с.
6. Жерносекова И. В. Изменчивость продуцента литических ферментов *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* и его селекция. Дис. ... канд. биол. наук. – К., 2002. – 150 с.
7. Закордонец Л. А. Влияние аланина и цистеина на образование биологически активных веществ *Fusarium sp.* / Л. А. Закордонец, С. М. Супрун // Микробиол. журн. – 1983. – Т. 45, № 1. – С. 39–43.
8. Иванова Е. Г. Аэробные метиловобактерии синтезируют ауксины / Е. Г. Иванова, Н. В. Доронина, Ю. А. Троценко // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 4. – С. 452–458.
9. Кравченко Л. В. Роль корневых экзометаболических в интеграции макроорганизма с растениями. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2000. – 51 с.
10. Мишке И. В. Микробные фитогормоны в растениеводстве. – Рига: Зинатне, 1988. – 151 с.
11. Мордухова Е. А. Синтез фитогормона индол-3-уксусной кислоты ризосферными бактериями рода *Pseudomonas* / Е. А. Мордухова, Н. П. Скворцова, В. В. Кочетков // Микробиология. – 1991. – Т. 60, № 3. – С. 494–500.
12. Муронец Е. М. Синтез индолилуксусной кислоты сапрофитной ассоциативной бактерией *Agrobacterium radiobacter* / Е. М. Муронец, Н. В. Белавина, Т. Н. Митронова // Микробиология. – 1997. – Т. 66, № 4. – С. 506–513.
13. Новак М. И. Регуляция биосинтеза цефалоспоринов *C* у штаммов *Acremonium chrysogenum* // Проблемы изыскания и биотехнологии новых антибиотиков. – Пушкино, 1982. – С. 23.
14. Прист Ф. Внеклеточные ферменты микроорганизмов. – М.: Мир, 1987. – 117 с.
15. Промышленная микробиология / Под ред. Н. С. Егорова. – М.: Высшая школа, 1989. – 688 с.
16. Современная микробиология. Прокариоты / Под ред. Й. Ленгелера. – М.: Мир, 2005. – Т. 1. – 656 с.
17. Стимуляция жизнедеятельности микроорганизмов и вирусов / Под ред. М. Х. Шигаевой. – Алма-Ата: Наука, 1986. – 184 с.
18. Тимаков В. Д. Микробиология. – М.: Медицина, 1983. – 512 с.
19. Цавкелова Е. А. Образование ауксинов бактериями, ассоциированными с корнями орхидей / Е. А. Цавкелова, Т. А. Чердынцева, А. И. Нетрусов // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 1. – С. 55–62.
20. Черногор Н. П. Дослідження рiстстимулюючих властивостей лiзоenzимного препарату *Streptomyces recifensis* variant *lyticus*. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – К., 1998. – 20 с.
21. Штейман Б. Р. Влияние некоторых аминокислот и других соединений на биосинтез тирозина / Б. Р. Штейман, Е. А. Середенко, А. М. Макухина // Проблемы изыскания и биотехнологии новых антибиотиков. – Пушкино, 1982. – С. 36–37.
22. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 1117–1123.
23. Fallik E. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum* / E. Fallik, Y. Okon // Ed. V. Okon. – London: C. R. C. – 1994. – P. 77–86.
24. Isono M. Bacteriolytic enzyme and process for the production thereof. Pat. 3649454 USA, C 12 K 1/06 / M. Isono, T. Takahashi, Y. Yamadzaki. – Pat. 1004.72.
25. Luengo J. M. Lysine regulation of penicillin biosynthesis in low producing and industrial strains of *Penicillium chrysogenum* / J. M. Luengo, G. Revilla // J. Gen. Microbiol. – 1979. – Vol. 115. – P. 207–211.
26. Menta R. Lysine stimulation of cephalosporin *C* synthesis in *C. aeramonium* / R. Mehta, J. L. Speth, C. H. Nach // Eur. J. Appl. Microb. and Biotech. – 1979. – Vol. 8. – P. 177–180.

Надійшла до редколегії 15.04.2007